小菜蛾气味结合蛋白 OBP2 基因的克隆、表达谱及其结合特性分析

程小娟[1,2,3,4], 蔡立君[1,2,3,*], 郑丽双[1,2,3,4], 覃江梅[1,2,3], 黄宇萍[1,2,3], 尤民生[1,2,3,*]

(1. 福建农林大学应用生态研究所, 福州 350002; 2. 农业部闽台作物有害生物综合治理重点实验室, 福州 350002; 3. 闽台特色作物病虫生态防控协同创新中心, 福州 350002; 4. 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002)

摘要:【目的】气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)在昆虫寄主定位、产卵地选择等行为中发挥重要作用,克隆与鉴定小菜蛾 *Plutella xylostella* OBP 基因、明确其与配体化合物的结合特性有助于阐明小菜蛾嗅觉识别的分子机制。【方法】利用 PCR 技术克隆小菜蛾 *OBP2*,对获得的编码序列全长进行信号肽及跨膜区域预测,用 DNAMAN 与其他昆虫的 *OBP2* 进行多序列比对,采用 MEGA5.0 邻接法(neighbor-joining method, NJ)构建进化树。通过实时定量 PCR(qRT-PCR)分析 *PxylOBP2* 在小菜蛾不同发育阶段和不同组织中的表达模式。构建原核表达载体 pET28a-*PxylOBP2*,进行原核表达及蛋白纯化。利用荧光竞争结合实验对 PxylOBP2 蛋白与 39 种配基化合物的结合特性进行分析。【结果】成功获得小菜蛾 OBP2 基因 *PxylOBP2*(GenBank 登录号: KT070562)的编码序列全长,其完整开放阅读框大小为 546 bp,编码 182 个氨基酸,具有气味结合蛋白典型的 6 个保守半胱氨酸结合位点。荧光定量 PCR 结果表明,发育表达模式显示,*PxylOBP2* 在未交配雄性成虫中的表达量均明显高于雌性成虫和已交配雄虫;组织表达模式显示,*PxylOBP2* 在足中的表达量高于其他组织。经预测成熟蛋白大小为 22.24 kDa,等电点 5.69。SDS-PAGE 结果显示融合蛋白成功表达。荧光竞争结合实验对 3 种性信息素和 36 种植物挥发物结合发现,PxylOBP2 与性信息素 *Z*-11-16:Ald 可以结合,解离常数 48.951 μmol/L;可以和 11 种寄主植物挥发物有效结合,其中,与芳樟醇、正壬醇结合能力最强,解离常数分别为 4.733 和 6.861 μmol/L。【结论】本研究明确了 *PxylOBP2* 的核苷酸、氨基酸序列,并根据 qRT-PCR 和荧光竞争结合实验结果,推断 *PxylOBP2* 与小菜蛾雄虫寻求配偶有关,且寄主挥发物芳樟醇、正壬醇起协同促进作用。

关键词: 小菜蛾; 气味结合蛋白; 气味; 基因表达; qRT-PCR; 荧光竞争结合

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2016)04-365-12

Cloning, expression profiling and binding characterization of the OBP2 gene in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)

CHENG Xiao-Juan[1,2,3,4], CAI Li-Jun[1,2,3,*], ZHENG Li-Shuang[1,2,3,4], QIN Jiang-Mei[1,2,3], HUANG Yu-Ping[1,2,3], YOU Min-Sheng [1,2,3,*] (1. Institute of Applied Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Fujian-Taiwan Joint Centre for Ecological Control of Crop Pests, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. Key Laboratory of Integrated Pest Management for Fujian-Taiwan Crops, Ministry of Agriculture, Fuzhou 350002, China; 4. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract:【Aim】Odorant binding proteins (OBPs) play crucial roles, functioning as transporting vectors of odors, in host location and oviposition selection for many insects. Cloning and identification of OBP genes and clarifying their ligand-binding characteristics of the compounds may help address the

基金项目: 国家自然科学基金项目(31230061, 31320103922, 31301666)

作者简介: 程小娟, 女, 1991 年 10 月生, 河南新乡人, 硕士, 研究方向为昆虫分子生态学研究, E-mail: 770311844@qq.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: msyou@iae.fjau.edu.cn; cai-lijun@live.cn

收稿日期 Received: 2016-01-29; 接受日期 Accepted: 2016-03-24

molecular mechanisms in *P. xylostella*.【Methods】*OBP*2 was cloned from *P. xylostella* based on PCR approach. Signal peptide and transmembrane region were predicted and the nucleotide sequence of *P. xylostella OBP*2 (*PxylOBP*2) was aligned with that of the homologs from other insects using DNAMAN. A neighbor-joining tree was constructed using MEGA5.0. Stage- and tissue-specific expressions of *PxylOBP*2 were profiled by using real-time quantitative PCR (qRT-PCR). Prokaryotic expression vector was constructed to express the recombinant protein, and the purified protein was detected by SDS-PAGE. The protein binding affinity of PxylOBP2 with 39 compounds was analyzed using fluorescence competitive binding assay.【Results】*PxylOBP*2 was successfully cloned and sequenced. Its ORF is 546 bp in length (GenBank accession no. KT070562), encoding 182 amino acids, and the encoded protein has six cysteine conserved domains, with the predicted molecular mass of 22.24 kDa and isoelectric point of 5.69. SDS-PAGE analysis showed that the fusion protein was successfully expressed. The expression profiling of *PxylOBP*2 exhibited a higher expression level in virgin male adults than in female adults and mated male adults, and the expression levels of *PxylOBP*2 in legs of male and female adults were higher than those in other tissues. The binding affinity test of PxylOBP2 to three sex pheromones and 36 different plant volatiles showed that PxylOBP2 could bind with *Z*-11-16:Ald, with a dissociation constant of 48.951 μmol/L, and with 11 plant volatiles, exhibiting a stronger capability of binding linalool and 1-nonanol with the dissociation constants of 4.733 and 6.861 μmol/L, respectively.【Conclusion】The nucleotide and amino acid sequences of *PxylOBP*2 were characterized. Based on qRT-PCR and competitive binding test results, we infer that PxylOBP2 may play important roles in adult courtship of the moth, and host plant volatiles play a synergism role.

Key words: *Plutella xylostella*; odorant binding proteins (OBPs); olfactory; gene expression; qRT-PCR; fluorescence competitive binding assay

小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.)属鳞翅目、菜蛾科,是危害十字花科作物的世界性害虫,全球每年因小菜蛾为害造成的直接损失和用于防治小菜蛾的费用高达 40~50 亿美元(Furlong *et al*., 2013)。该虫年发生世代多,繁殖能力强,寄主范围广,并且抗药性逐年增加,防治困难,造成的危害不断扩大,给我国蔬菜产业构成严重威胁。因而迫切需要探索高效、无害化防治小菜蛾的新途径。

嗅觉在昆虫的生理和行为方面起着重要的作用(Liu *et al*., 2015)。气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)参与昆虫专一性识别外界环境的第一步生化反应(Li and Prestwich, 1997)。气味分子首先通过触角感受器表面的极孔进入触角感受器并与 OBPs 结合,然后通过亲水性的感器淋巴液到达气味受体(odorant receptors, ORs),导致化学信号转变为电信号,从而产生相应的行为反应。OBP 家族具有保守结构域,是水溶性的酸性蛋白,由 140~160 个核苷酸组成,pH 值 4~6(Pelosi *et al*., 2006)。典型的昆虫 OBPs 氨基酸序列通常含有 6 个高度保守的半胱氨酸残基,其保守序列常被用来鉴定昆虫的 OBPs (Vogt and Riddiford, 1981; Leal *et al*., 1999),依据昆虫 OBPs 氨基酸序列同源性与其识别气味分子的差别,可将其分为性信息素结合蛋白(pheromone binding proteins, PBPs)、普通气味结合蛋白(general binding protein, GOBPs)和触角结合蛋白(antennal binding proteins, ABPs)3 大类(Robertson *et al*., 1999)。目前根据序列中半胱氨酸的个数,可将 OBPs 分为"Classic","Minus-C","Plus-C","Dimer"以及"Atypical"等 5 类(Hekmat-Scafe *et al*., 2002; Zhou *et al*., 2004; Manoharan *et al*., 2013)。

Vogt 和 Riddiford(1981)通过性外激素标记的方法,首次从雄性多音天蚕蛾 *Antheraea polyphemus* 中发现性信息素结合蛋白;之后普通气味结合蛋白在鳞翅目昆虫中被发现(Breer *et al*., 1990);1994 年触角结合蛋白在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中被发现(McKenna *et al*., 1994);1996 年家蚕 *Bombyx mori* 的触角结合蛋白也被发现(Krieger *et al*., 1996)。OBPs 可以选择性地绑定气味分子,配体结合的研究已经在很多昆虫中完成,如鳞翅目的小菜蛾、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis*(Gong *et al*., 2009; Li *et al*., 2013; Sun *et al*., 2013),直翅目的飞蝗 *Locusta*

migratoria（Jiang *et al.*, 2009），双翅目的桔小食心蝇 *Bactrocera dorsalis*（陈玲等，2013）；鞘翅目的暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela*（Ju *et al.*, 2012），以及膜翅目的西方蜜蜂 *Apis mellifera*（Spinelli *et al.*, 2012），以及半翅目的褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stäl（He *et al.*, 2011）。目前有关小菜蛾 OBPs 的研究甚少，在小菜蛾中只鉴定出 5 个 OBPs，其中包括 2 个 GOBPs（PxylGOBP1 和 PxylGOBP2）（Zhang *et al.*, 2009）和 3 个 PBPs（PxylPBP1，PxylPBP2 和 PxylPBP3）（Sun *et al.*, 2013）。其中，小菜蛾 2 个 GOBPs 基因与其他鳞翅目昆虫的 GOBPs 氨基酸序列一致性达到 70% ~80%，但两者之间的一致性只有 50%；利用实时荧光定量 PCR 验证其表达模式，GOBPs 在雌雄虫触角特异表达，在其他虫龄稳定表达。Sun 等(2013)通过分子克隆的方法鉴定出 3 个 PBP 基因，这 3 个基因在小菜蛾触角中特异性表达，组织表达谱的分析有助于我们进一步分析其功能。

基于小菜蛾基因组数据库（You *et al.*, 2013）的分析，转录组数据显示小菜蛾 OBP2 基因 RPKM 值在雄性成虫中比较高。为了深入探究 PxylOBP2 的功能，我们研究了组织表达模式，并对其进行体外原核表达，蛋白纯化得到 PxylOBP2 重组蛋白。通过荧光竞争结合实验比较重组蛋白与 39 种气味分子的结合能力强弱，以期对小菜蛾嗅觉识别机制有进一步的了解，同时也为深入研究小菜蛾 OBPs 的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

供试小菜蛾为福建农林大学田间试验室常年饲养的敏感品系。幼虫以萝卜苗饲养传代，养虫室温度条件为 25 ±1℃，相对湿度 75% ~80%，光周期为 16L∶8D。以 5% 蜂蜜水喂养成虫。收集小菜蛾不同的发育历期（虫卵、1 -4 龄幼虫、雌雄蛹、未交配雌成虫、未交配雄成虫、已交配雌成虫和已交配雄成虫）的 11 个样品及不同组织（4 龄幼虫头部、中肠，雌雄虫头部、触角和足）的 8 个样品，共 19 个虫样，液氮冷冻，置于 -80℃冰箱待用。

1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒 Trizol 购自 Invitrogen；反转录试剂盒 GoScript™ Reverse Transcription System、荧光定量 PCR 试剂盒 GoTaq® qPCR Master Mix、DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、pGEM-T Easy Vector System I 载体和 T_4 DNA 连接酶均购自美国 Promega；*TransStart*® *TopTaq* DNA Polymerase 购自北京全式金；DNA Marker DL1000，DL2000，Premixed Protein Marker，以及限制性内切酶 *Nco* I 和 *Xho* I 均购自 TaKaRa；Goldview 核酸染料购自赛默飞；pET28a，DH5α 和 BL21（DE3）为实验室保存的菌种；引物由铂尚生物技术（上海）有限公司合成。

1.3 引物的设计及合成

根据预测的序列，利用 Primer Premier 5.0 软件设计相应引物（表 1），并在 cDNA 克隆引物上下游加上酶切位点 *Nco* I 和 *Xho* I（下划线表示），同时用小菜蛾 *RPS4* 和 *RPL8* 基因作为内参基因，用于校准基因的表达。

1.4 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

取 100 头大小一致的 4 龄幼虫，先用无酶水清洗干净，然后用 75% 的酒精清洗消毒，再用无酶水清洗去除虫体表面残留的酒精，随后将消毒并清洗干净的虫体置于光学显微镜下，用镊子（先在酒精灯下灼烧，并用 75% 酒精消毒）划破虫子体表，小心拉出肠道，去除后肠和马氏管，只保留中肠，将取出的中肠转移至装有 RNALater 的 2 mL 离心管（本实验涉及的小菜蛾的不同组织的解剖方法类似），按照 Trizol 试剂盒说明书提取 RNA，1% 琼脂糖检测，核酸蛋白检测仪检测浓度，之后按照反转录说明书进行反转录合成第一条 cDNA 链。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物用途 Use of primers	引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequence
cDNA 克隆	OBP2-F	CATG<u>CCATGG</u>GCACGAAAATCATGAACCTACC
cDNA cloning	OBP2-R	CCG<u>CTCGAG</u>TAGTTCGTCTTTAAGCAATTGT
实时荧光定量 PCR	OBP2-F	CTCAAGGGAAATGCTTCGTGG
qRT-PCR	OBP2-R	GCTGTCGTCTCCATACACTGCC
RPS4 内参基因扩增	16881-F	ATGGATGTTGTGTCGATTGAAAAGA
Amplification of the reference gene *RPS4*	16881-R	GAGTGATGCGGTGGATGGTGA
RPL8 内参基因扩增	9839-F	CGGTCGTGCCTACAAATACA
Amplification of the reference gene *RPL8*	9839-R	CGTGAGGATGCTCCACAGGGT

下划线示酶切位点。Restriction sites are underlined.

1.5 小菜蛾气味结合蛋白 OBP2 全长 cDNA 序列克隆及重组质粒构建

以反转录合成的小菜蛾雄性成虫第一条 cDNA 链为模板,PCR 扩增获得小菜蛾 OBP2 基因的开放阅读框全长。采用 *Trans Start*® *Top Taq* 进行 PCR 扩增,反应条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,38 个循环;72℃延伸 10 min。胶回收,测浓度之后连接至 pGEM-T 载体,转化 DH5α 感受态细胞,挑单克隆进行菌液 PCR 验证,最后将验证的阳性菌液送至铂尚生物公司双向(T7 和 SP6)测序。将测序正确的质粒与 pET28a 载体分别经 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切后,用 T_4DNA 连接酶连接。连接产物转化到大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中,培养 12 h 后挑取阳性克隆菌落,经菌液 PCR 验证成功后用于原核表达。

1.6 序列分析和进化树构建

首先利用 Primer Premier 5.0 将核苷酸序列翻译成蛋白序列,再利用 ExPASy 软件中的 Compute pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/)程序预测蛋白的分子量和等电点;利用 SignalP 4.1 软件(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)对 *PxylOBP*2 进行信号肽预测;用在线预测软件 TMHMMv2.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)对小菜蛾 OBP2 蛋白质序列进行跨膜序列分析。

将测序结果利用 Uniprot 在线 BLAST(http://www.uniprot.org/blast/)进行序列相似性搜索,采用 DNAMAN 软件进行蛋白序列的同源性比对,获得小菜蛾 *PxylOBP*2 与其他昆虫相关基因序列的比对结果,并利用 MEGA5.0 软件中的邻接法(Bootrap 为 1 000次)构建基因的系统进化树。

1.7 小菜蛾气味结合蛋白基因 *OBP*2 表达谱分析

按照 Promega 公司的 GoTaq® qPCR Master Mix 试剂盒说明书进行实验操作,扩增反应体系为 20 μL:上下游引物各 0.4 μL, ddH_2O 7.2 μL, GoTaq® qPCR Master Mix 10 μL, 模板 2 μL。反应条件:预变性 95℃,3 min;变性 95℃,15 s,退火温度 60℃,35 s,溶解温度 63℃,44 个循环。

1.8 重组蛋白表达条件的优化和纯化

将鉴定正确 pET-*PxylOBP*2 菌液接种于含卡那霉素(kanamycin)抗性的 LB 液体培养基(卡那霉素终浓度 100 μg/mL)中,37℃过夜培养,次日,按 1% 接种量将过夜活化的菌液接种于 5 mL 的 LB 培养液中,37℃ 200 r/min 培养 2~3 h 至 OD_{600} =0.6,添加 IPTG 至终浓度为 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 和 0.9 mmol/L,37℃ 200 r/min 诱导 8 h 表达目的蛋白;0.5 mmol/L IPTG 浓度下每 2 h 收集菌液 1 mL 共 4 管;另取一瓶加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L,28℃诱导 8 h,然后用 PBS 溶液重新悬浮菌体沉淀后超声波处理 5 min 破碎菌体细胞,16 000 r/min 高速离心分别获得上清和包涵体;最后,利用聚丙烯酰氨凝胶电泳确定表达形式,其表达形式若为包涵体,则需进行包涵体的变性及复性处理。

目的蛋白纯化:上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,然后用镍柱纯化目的蛋白,用不同浓度咪唑(10, 20, 50, 80, 100, 200, 250, 300, 350, 400 和 500 mmol/L)洗脱缓冲液对镍柱进行梯度洗脱,经 SDS 电泳检测,将含有目的蛋白的洗脱液转移到装有 Tris 缓冲液的透析袋(截流量 3.5 kDa)中,透析过夜。

1.9 兔抗小菜蛾 OBP2 多克隆抗体特异性的 Western blot 检测

SDS-PAGE 电泳至溴酚蓝跑出玻璃板即可终止电泳,在 45 mA 条件下转膜 15 min 至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭过夜。制备的 PxylOBP2 多克隆抗体作为一抗,1∶2 000(v/v)稀释后,室温摇床缓慢孵育 2 h,PBST 洗涤 5~10 min,洗涤 3 次;用 1∶5 000(v/v)稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗,常温摇床缓慢孵育 2 h,PBST 洗 5~10 min,洗涤 3 次,洗涤结束后,去除洗涤液,加入 DAB 染色工作液显色。

1.10 小菜蛾 PxylOBP2 重组蛋白的配基结合实验

荧光竞争结合试验可以研究 PxylOBP2 与不同种类气味分子的结合能力。我们选取了 3 种性信息素,36 种植物挥发物,包括寄主十字花科植物挥发物和趋避植物番茄挥发物。具体步骤如下:设置荧光分光光度计激发光波长为 337 nm,扫描发射波长范围 350~550 nm。在荧光比色皿中加入 1-NPN 和蛋白的混合液(终浓度均为 2 μmol/L),静置 2 min 使充分反应,测定荧光强度,然后将溶于甲醇的气味标样(终浓度为 l μmol/L)依次加到荧光比色皿中,浓度从 2~16 μmol/L 依次递增,静置 2 min,待荧光强度稳定后,记录最大荧光值,每种气味样品重复测试 3 次(Xu *et al.*, 2010)。

为了测定蛋白的结合浓度,以 417 nm(最大发射光谱处)的荧光强度值对 1-NPN 浓度作图。用 Scatchard 法线性化该曲线。假设蛋白活性为 100%,并且在饱和状态下,气味分子与蛋白 1∶1(m/m)结合,根据气味物质的 IC_{50}值(配基替换 50% 探针时的浓度),计算配基的解离常数 K_i(K_i = IC_{50}/

[I + (1-NPN)/$K_{1\text{-NPN}}$])。计算公式中，(1-NPN)是未结合 1-NPN 浓度：$K_{1\text{-NPN}}$ 为 OBP/1-NPN 复合物的解离常数。解离常数越小，表示蛋白与气味分子的结合能力越强。

1.11　数据处理

表达谱数据处理：$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法(Livak and Schmittgen, 2001)可用来衡量基因的相对表达情况，基于前面的实验方法分别对每个模板的 3 个生物学重复数据进行分析，使用 SPSS 软件进行 ANOVA 单因素方差分析，$P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2　结果

2.1　小菜蛾气味结合蛋白基因 cDNA 的克隆及序列分析

以小菜蛾雄性成虫 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增，得到了一条特异性条带，测序结果表明该片段大小为 546 bp，并通过序列比对发现与转录组(You *et al.*, 2013)所得该序列 100% 一致(图 1)，将其命名为 *PxylOBP*2(GenBank 登录号：KT070562)。

```
1   ATGAACCTACCTCAAGTTTCACCCTTCCAACCATTTTCCAAGGAAGAGCAGTTGACAAGG
     M  N  L  P  Q  V  S  P  F  Q  P  F  S  K  E  E  Q  L  T  R

61  ATCAAGAAAATGAACGAAGAAGTGGAACCATTCCGCAAGAATCTCACCGAATGCGCACAC
     I  K  K  M  N  E  E  V  E  P  F  R  K  N  L  T  E  C  A  H

121 CAGGTCAAAGCGAAAGCGACAGATGTGGAGGATTTCCTGAAAAGAATACCACAGTCAACT
     Q  V  K  A  K  A  T  D  V  E  D  F  L  K  R  I  P  Q  S  T

181 GCTCAAGGGAAATGCTTCGTCGCGTGCATTCTCAAAAGAAACGAGTTGATAAAAAACAAC
     A  Q  G  K  C  F  V  A  C  I  L  K  R  N  E  L  I  K  N  N

241 AAAATACAGAAGGAAAGCCTCATAGAAGTTAATCGGGCAGTGTATGGAGACGACAGCGAG
     K  I  Q  K  E  S  L  I  E  V  N  R  A  V  Y  G  D  D  S  E

301 GTCATGGCCCGCCTGAAGACAGCCATAATTGAATGCGAAGAGGTGGTATCCGACATATTT
     V  M  A  R  L  K  T  A  I  I  E  C  E  E  V  V  S  D  I  F

361 GAGATTTGCGAGTATGCATCCATGTTTAATGACTGTATGCATATGAAAATGGAACATATT
     E  I  C  E  Y  A  S  M  F  N  D  C  M  H  M  K  M  E  H  I

421 CTCGACAAAGTGACTATGGATAGGAGGATGAAAGCCCTCGGACAGATGGCATCGGCCGAC
     L  D  K  V  T  M  D  R  R  M  K  A  L  G  Q  M  A  S  A  D

481 GCTTATACGGACGATTGGACTGAAGATGACGATGAAATATTACAATTGCTTAAAGACGAA
     A  Y  T  D  D  W  T  E  D  D  D  E  I  L  Q  L  L  K  D  E

541 CTATAA
     L  *
```

图 1　小菜蛾 *PxylOBP*2 基因的核酸序列及氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *PxylOBP*2 gene of *Plutella xylostella*

星号表示终止密码子，方框内表示保守的半胱氨酸。The stop codon is indicated with an asterisk, and conserved cysteines are boxed.

*PxylOBP*2 开放阅读框(open reading frame, ORF)包含 546 个核苷酸，编码 182 个氨基酸，推导的氨基酸序列具有昆虫气味结合蛋白的典型特征，具有 6 个保守的半胱氨酸残基(图 2)，其排列方式为：$C1\text{-}X_{27}\text{-}C2\text{-}X3\text{-}C3\text{-}X_{43}\text{-}C4\text{-}X_{11}\text{-}C5\text{-}X8\text{-}C6$ 符合典型 OBPs(classical OBPs)(Hekmat-Scafe *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2004, 2008; Zhou, 2010)。通过 ExPASy 软件中的 Compute pI/Mw 在线预测该成熟蛋白大小 22.24 kDa，等电点 5.69。

2.2　PxylOBP2 氨基酸序列的比对及系统进化分析

Uniprot 在线 BLAST 对 *PxylOBP*2 序列进行序列相似性搜索(E-value 小于 10e-3)，22 个序列中鳞翅目和半翅目昆虫最多，均占总量的 31.81%；其次是双翅目昆虫，占 27.27%；数量较少的为鞘翅目，占 9.09%。序列一致性最高的为帝王斑蝶 *Danaus plexippus DpleOBP*2(GenBank 登录号：KGM02358)，氨基酸序列一致性为 71.2%，其次是家蚕 *BmorOBP*2(GenBank 登录号：FM876235)，氨基酸序列一致性为 70.5%，与其他昆虫的同源序列氨基酸序列一致性均在 24.5% ~67.0% 之间。

采用 MEGA5.0 的邻接法对比对的 5 个目 18 种昆虫的 23 个气味结合蛋白构建进化树(图 3)，重复抽样 1 000 次，小菜蛾与同属于鳞翅目的帝王斑蝶、家蚕和二化螟 *Chilo suppressalis* 首先聚为一类，而半

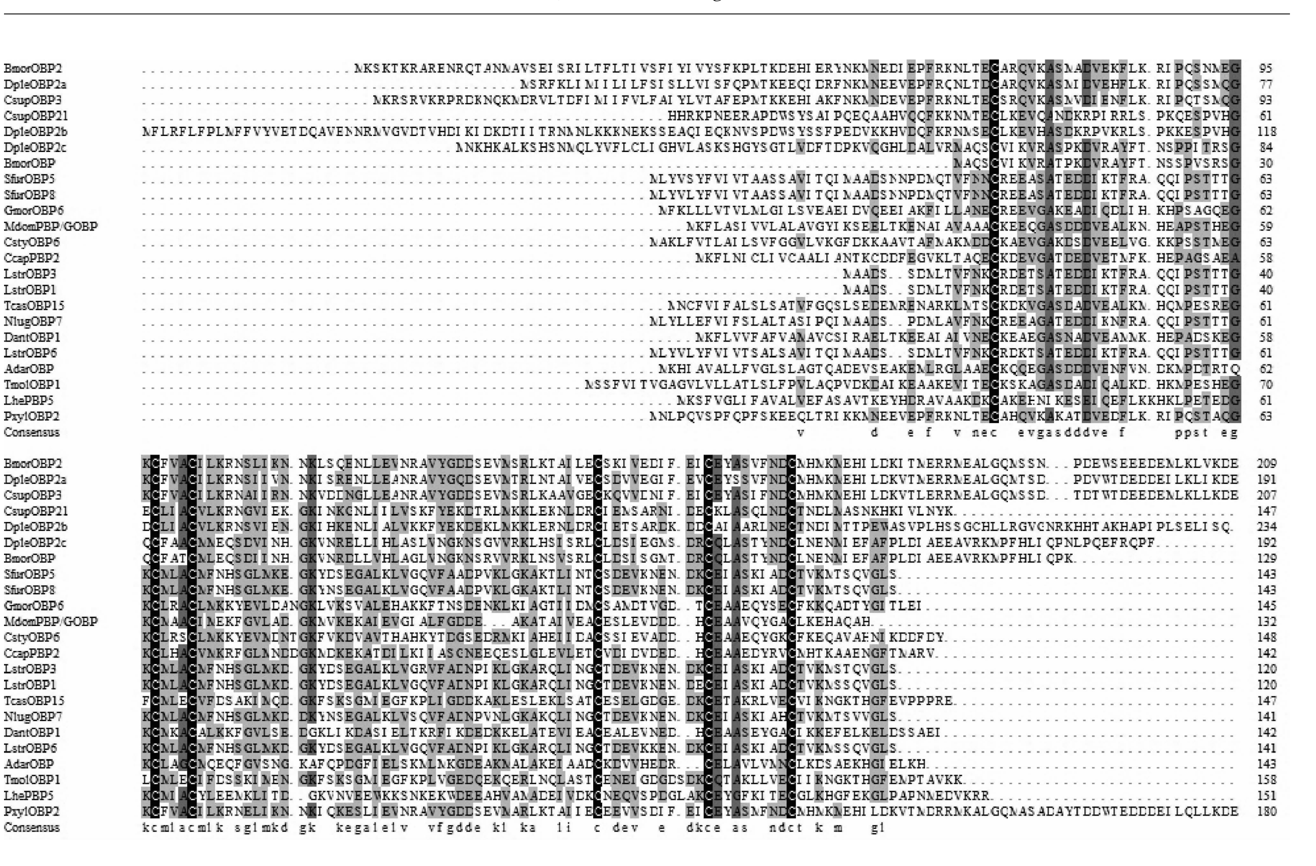


图 2 *PxylOBP2* 与其他昆虫 OBPs 序列比对

Fig. 2 Alignment of PxylOBP2 with OBPs from other insects

6 个保守的半胱氨酸用黑色阴影标出,灰色阴影表示同源氨基酸。The six cysteine and homologous residues are shaded in black and gray, respectively.

翅目的白背飞虱 *Sogatella furcifera*、灰飞虱 *Laodelphax striatella* 和褐飞虱等聚为另一分支。

2.3 小菜蛾 *PxylOBP2* 的表达谱分析

以内参基因的表达量为基准,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法研究 *PxylOBP2* 在不同发育阶段表达量的高低。结果表明,*PxylOBP2* 在未交配雄性成虫中的相对表达量显著高于雌性成虫以及其他发育阶段(图 4: A);在不同组织中,*PxylOBP2* 基因在雄虫足中的表达量最高,其次是雄虫触角、雄虫头部和雌虫足中(图 4: B)。

2.4 pET-OBP2 重组蛋白的表达及纯化

不同 IPTG 浓度诱导结果[图 5(A): 3 – 7 泳道]显示,IPTG 浓度对于 PxylOBP2 蛋白的表达影响不大;经 0.5 mmol/L IPTG 诱导的 8 h 内每 2 h 取 1 mL菌液[图 5(B): 9 – 13 泳道],结果显示 6 h 时蛋白表达量最高。不同温度及表达形式[图 5(C): 18 – 21 泳道]可看出 28℃表达量低于 37℃,目的蛋白主要集中在包涵体。其理论大小21 kDa,表达的融合蛋白大小 22.24 kDa。目的蛋白在 30 mmol/L 咪唑时就可以洗脱,随着咪唑浓度的增加,目的蛋白浓度逐渐增加(图 6: A)。包涵体纯化后送往公司制备多克隆抗体,表达的重组蛋白可以和兔抗小菜蛾 OBP2 抗体发生特异的血清反应(图 6: B),未免疫前兔子血清为阴性对照,表明小菜蛾 OBP2 原核表达成功,多克隆抗体制备成功。

2.5 PxylOBP2 与不同气味分子结合能力分析

根据 Scachard 方程将 1-NPN 与 PxylOBP2 的结合曲线线性化,得到 PxylOBP2 与 1-NPN 的解离常数是 10.18 μmol/L (图 7)。采用荧光竞争结合实验测定了 PxylOBP2 与 39 种挥发性气味的结合能力,结果显示(图 8,表 2):3 种性信息素中,PxylOBP2 只与顺11-16 碳烯乙酸酯结合,结合能力较弱,解离常数为 48.95 μmol/L;36 种挥发物中,PxylOBP2 只与 11 种结合,其中与芳樟醇、正壬醇结合能力最强,解离常数分别为 4.73 和 6.86 μmol/L,与苯甲醛、乙酸香叶酯和 α-蒎烯结合能力较强,与己醛、正庚醛、苯乙醛、异戊酸叶醇酯、罗勒烯和 β-紫罗兰酮结合能力一般。

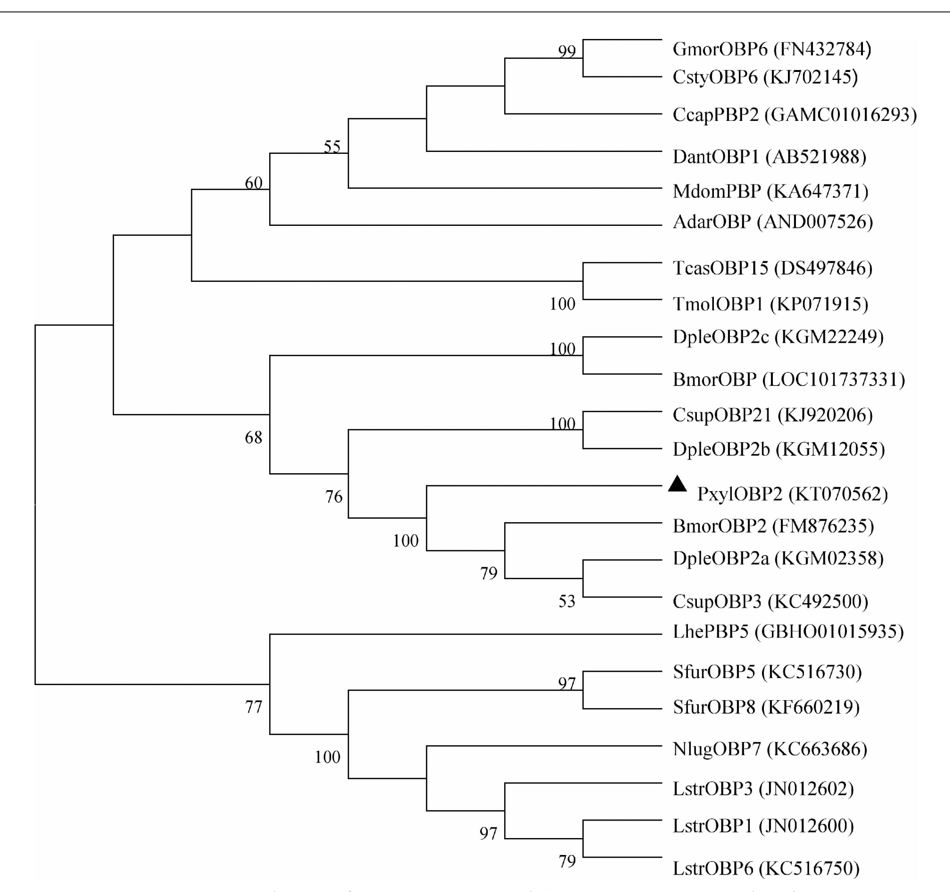


图 3　基于氨基酸序列构建的 PxylOBP2 及其他昆虫 OBPs 的进化树(邻接法)

Fig. 3　Neighbor-joining tree of PxylOBP2 and OBPs from other insects based on amino acid sequences

OBPs 序列的来源 The origin of OBPs sequences：BmorOBP2：家蚕 *Bombyx mori*，鳞翅目 Lepidoptera；DpleOBP2a：帝王斑蝶 *Danaus plexippus*，鳞翅目 Lepidoptera；CsupOBP3：二化螟 *Chilo suppressalis*，鳞翅目 Lepidoptera；CsupOBP21：二化螟 *Chilo suppressalis*，鳞翅目 Lepidoptera；DpleOBP2b：帝王斑蝶 *Danaus plexippus*，鳞翅目 Lepidoptera；DpleOBP2c：帝王斑蝶 *Danaus plexippus*，鳞翅目 Lepidoptera；BmorOBP：家蚕 *Bombyx mori*，鳞翅目 Lepidoptera，SfurOBP5：白背飞虱 *Sogatella furcifera*，半翅目 Hemiptera；SfurOBP8：白背飞虱 *Sogatella furcifera*，半翅目 Hemiptera；GmorOBP6：刺舌蝇 *Glossina morsitans morsitans*，双翅目 Diptera；MdomPBP/GOBP：家蝇 *Musca domestica*，双翅目 Diptera；CstyOBP6：丽蝇 *Calliphora stygia*，双翅目 Diptera；CcapPBP2：地中海实蝇 *Ceratitis capitata*，双翅目 Diptera；LstrOBP3：灰飞虱 *Laodelphax striatella*，半翅目 Hemiptera；LstrOBP1：灰飞虱 *Laodelphax striatella*，半翅目 Hemiptera；TcasOBP15：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*，鞘翅目 Coleoptera；NlugOBP7：褐飞虱 *Nilaparvata lugens*，半翅目 Hemiptera；DantOBP1：葱蝇 *Delia antiqua*，双翅目 Diptera；LstrOBP6：灰飞虱 *Laodelphax striatella*，半翅目 Hemiptera；AdarOBP：达氏按蚊 *Anopheles darlingi*，双翅目 Diptera；TmolOBP1：黄粉虫 *Tenebrio molitor*，鞘翅目 Coleoptera；LhesPBP5：牧草盲蝽 *Lygus hesperus*，半翅目 Hemiptera. 各序列名称后为序列的 GenBank 登录号。The GenBank accession numbers are listed after the sequence names.

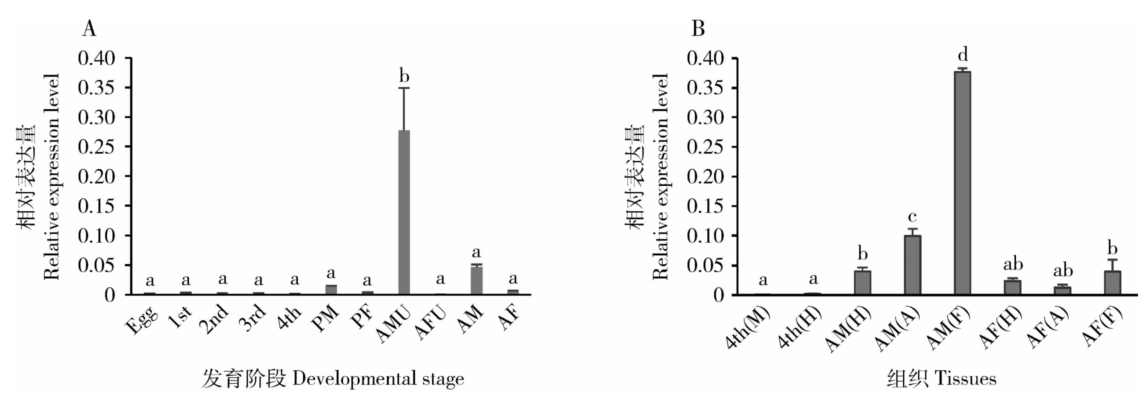


图 4　*PxylOBP2* 在小菜蛾不同发育阶段(A)和不同组织(B)的表达模式

Fig. 4　Stage-specific and tissue-specific expression profiling of *PxylOBP2* in *Plutella xylostella* detected by qRT-PCR

A. Egg：卵 Egg；1st：1 龄幼虫 1st instar larva；2nd：2 龄幼虫 2nd instar larva；3rd：3 龄幼虫 3rd instar larva；4th：4 龄幼虫 4th instar larva；PM：雄蛹 Male pupa；PF：雌蛹 Female pupa；AMU：未交配雄虫 Unmated male adult；AFU：未交配雌虫 Unmated female adult；AM：已交配雄虫 Mated male adult；AF：已交配雌虫 Mated female adult. B. 4th(M)：4 龄幼虫中肠 Midgut of the 4th instar larvae；4th(H)：4 龄幼虫头部 Head of the 4th instar larvae；AM(H)：雄成虫头部 Head of male adults；AM(A)：雄成虫触角 Antennae of male adults；AM(F)：雄成虫足 Foot of male adults；AF(H)：雌成虫头部 Head of female adults；AF(A)：雌成虫触角 Antennae of female adults；AF(F)：雌成虫足 Foot of female adults.

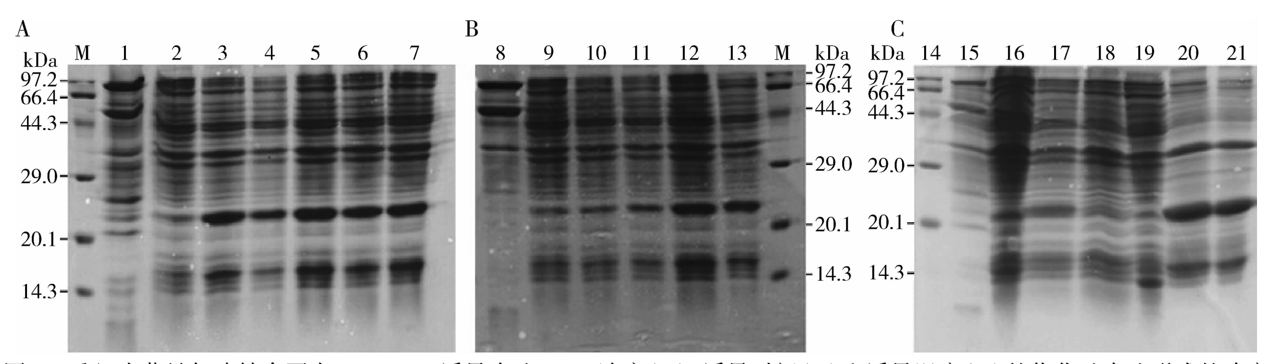


图 5 重组小菜蛾气味结合蛋白 PxylOBP2 诱导表达 IPTG 浓度(A)、诱导时间(B)和诱导温度(C)的优化及表达形式的确定

Fig. 5 Optimization of IPTG concentration (A), induction time (B), and induction temperature (C) in induced expression of the recombinant PxylOBP2 and determination the forms of expression

M：蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker；1：pET28a 空质粒的表达 Expression products of pET28a；2 – 7：IPTG 浓度分别为 0，0.1，0.3，0.5，0.7 和 0.9 mmol/L 的表达产物 Expression products induced by 0.1，0.3，0.5，0.7 and 0.9 mmol/L of IPTG，respectively；8：pET28a 空质粒的表达 Expression products of pET28a；9 – 13：分别为 IPTG 诱导 0，2，4，6 和 8 h 的表达产物 Expression products induced by IPTG for 0，2，4，6 and 8 h，respectively；14：pET28a 空质粒的表达 Expression products of pET28a；15：未经 IPTG 诱导的 pET28a- PxylOBP2 表达 Expression products of pET28a- PxylOBP2 non-induced by IPTG；16 – 17：分别为 37 和 28℃温度下 PxylOBP2 的表达产物 Expression products of PxylOBP2 induced by IPTG at 37 and 28℃，respectively；18 – 19：分别为 37 和 28℃温度下 PxylOBP2 上清表达量 Expression products of PxylOBP2 in supernatant at 37 and 28℃，respectively；20 – 21：分别为 37 和 28℃温度下 PxylOBP2 包涵体的表达量 Expression products of PxylOBP2 in sediment at 37 and 28℃，respectively；

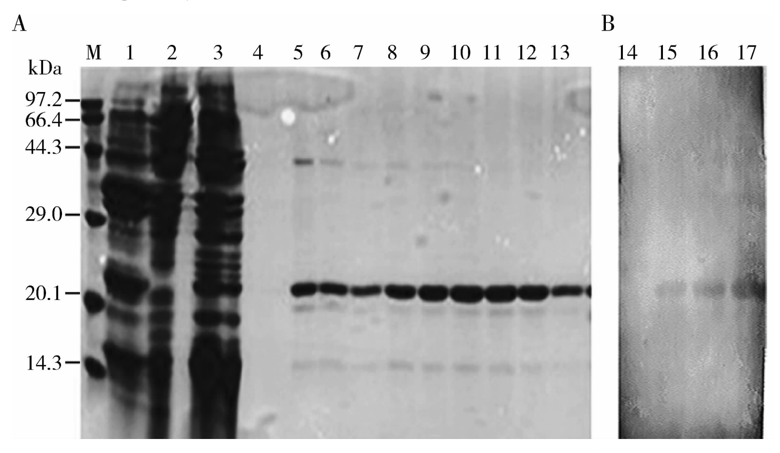


图 6 重组小菜蛾气味结合蛋白 PxylOBP2 的纯化及多克隆抗体的 Western blot 检测

Fig. 6 Purification of the recombinant PxylOBP2 and specificity of polyclonal antibody detect by Western blotting

M：蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker；1 – 3：分别为 pET-PxylOBP2 包涵体、上清和流出液 Sediment，supernatant and effluent of pET-PxylOBP2，respectively；4：10 mmol/L 咪唑洗杂蛋白 Target protein eluted with 10 mmol/L imidazole；5 – 13：分别为 30，40，50，60，70，80，90，100，150 和 200 mmol/L 咪唑梯度洗脱目的蛋白 Target protein eluted with 30，40，50，60，70，80，90，100，150 and 200 mmol/L imidazole，respectively；14：未免疫兔子血清为阴性对照 Non-immune rabbit serum as the negative control；15 – 17：纯化的融合蛋白 Western blot 检测 Purified fusion protein detected by Western blotting.

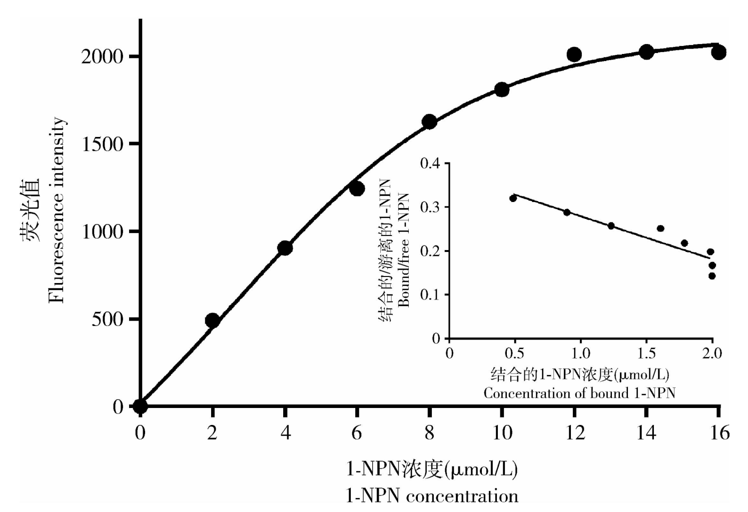


图 7 1-NPN 与 PxylOBP2 蛋白的结合曲线

Fig. 7 Binding curve of 1-NPN to PxylOBP2

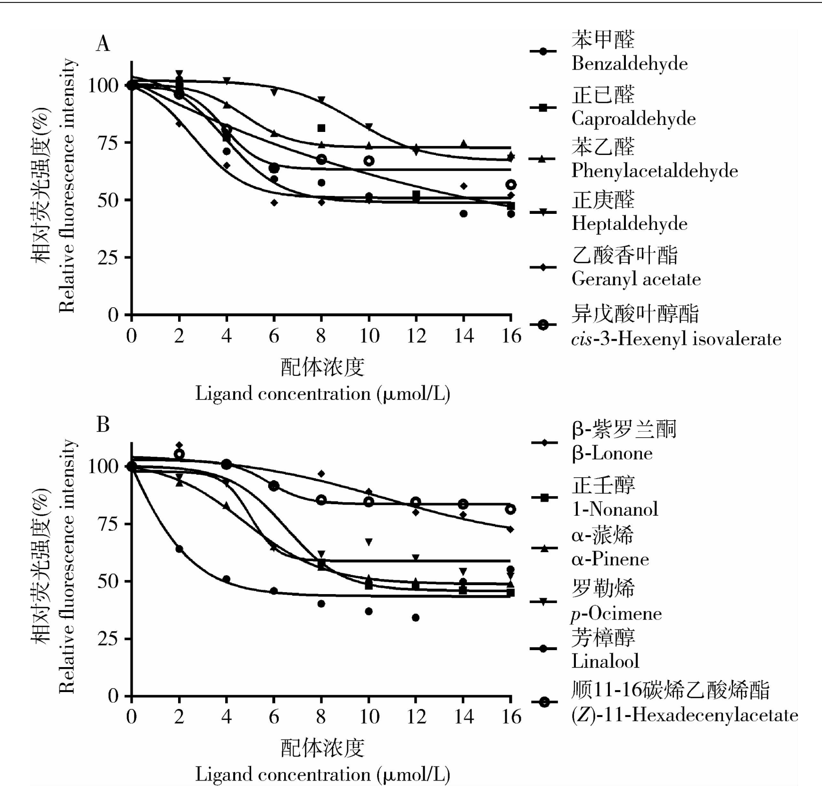


图 8　配基与 1-NPN 竞争结合重组蛋白 PxylOBP2

Fig. 8　Competitive binding of ligands with 1-NPN to recombinant PxylOBP2

表 2　候选配基与 1-NPN 竞争结合重组蛋白 PxylOBP2

Table 2　Competitive binding of candidate ligands with 1-NPN to recombinant PxylOBP2

配体 Ligands	CAS 登记号 CAS no.	IC_{50} (μmol/L)	Ki (μmol/L)
顺 11-16 碳烯醛(*Z*)-11-Hexadecenal	53939-28-9	–	–
顺 11-16 碳烯醇(*Z*)-Hexadec-11-en-1-ol	56683-54-6	66.92	60.93
顺 11-16 碳烯乙酸酯(*Z*)-11-Hexadecenylacetate	34010-21-4	53.76	48.95
正已醇 Hexyl alcohol	111-27-3	65.18	59.35
香叶醇 Geraniol	106-24-1	118.70	108.08
里那醇 Linalool	78-70-6	5.20	4.73
2,5-已二醇 2,5-Hexanediol	2935-44-6	–	–
橙花叔醇 Nerolidol	721-44-4	–	–
苯甲醇 Benzyl alcohol	100-51-6	–	–
β-香茅醇 β-Citronellol	106-22-9	772.90	703.77
正壬醇 1-Nonanol	143-08-8	7.54	6.86
反式-2-已烯醇 *trans*-2-Hexen-1-ol	928-95-0	–	–
顺-3-已烯-1-醇(*Z*)-3-Hexen-1-ol	928-96-1	–	–
正辛醇 Capryl alcohol	111-87-5	–	–
苯甲醛 Benzaldehyde	100-52-7	11.09	10.10
正已醛 Caproaldehyde	66-25-1	23.35	21.26
苯乙醛 Phenylacetaldehyde	122-78-1	53.27	48.51
正庚醛 Heptaldehyde	111-71-7	45.17	41.13
(*R*)-(+)-柠檬烯(*R*)-(+)-Limonene	5989-27-5	–	–
α-蒎烯 α-Pinene	80-56-8	12.28	11.18
(+)3-莰烯(+)3-Camphene	79-92-5	–	–
罗勒烯 *p*-Ocimene	13877-91-3	34.66	31.56
月桂烯 Myrcene	123-35-3	–	–

续表 2 Table 2 continued

配体 Ligands	CAS 登记号 CAS no.	IC_{50} (μmol/L)	Ki (μmol/L)
α-水芹烯 α-Phellandrene	99-83-2	–	–
α-法呢烯 α-Farnesene	502-61-4	–	–
β-石竹烯 β-Caryophyllene	87-44-5	–	–
萜品油烯 Terpinolene	586-62-9	–	–
苯甲酸 Benzoic acid	65-85-0	–	–
水杨酸甲酯 Methyl salicylate	119-36-8	–	–
邻苯二甲酸二异丁酯 Diisobutyl phthalate	84-69-5	118.70	108.08
乙酸香叶酯 Geranyl acetate	105-87-3	11.85	10.79
乙酸叶醇酯 Leaf acetate	3681-71-8	175.70	159.98
异戊酸叶醇酯 *cis*-3-Hexenyl isovalerate	35154-45-1	31.73	28.89
甲基茉莉酸酯 Methyl epi-jasmonate	39924-52-2	–	–
β-紫罗兰酮 β-Ionone	79-77-6	38.88	35.40
甲基庚烯酮 6-Methyl-5-hepten-2-one	110-93-0	–	–
正十六烷 Hexeadecane	544-76-3	89.05	81.08
2,6-二叔丁基对甲酚 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol	128-37-0	209.40	190.67
桉树脑 Cineole	470-82-6	–	–

–：不能计算出 IC_{50}（The IC_{50} value was unable to be calculated）.

3 讨论与结论

小菜蛾是为害十字花科作物的主要害虫，该虫年发生世代多，繁殖能力强，寄主范围广泛，并且抗药性逐年增加，防治困难，造成的危害不断扩大，给我国蔬菜产业构成严重威胁。很多学者已经将小菜蛾嗅觉作为研究的重点（刘一鹏等，2015）。本研究克隆了一个小菜蛾 OBP 基因，该基因与帝王斑蝶 *DpleOBP2* 基因同源性最高（氨基酸序列一致性为 71%），命名为 *PxylOBP2*。经过序列分析，PxylOBP2 呈酸性，成熟蛋白大小约 22.24 kDa，具有典型的 6 个半胱氨酸位点，属于典型气味结合蛋白。进化树分析结果表明，PxylOBP2 与鳞翅目昆虫（帝王斑蝶、家蚕和二化螟）的 OBPs 亲缘性较高，与半翅目的白背飞虱、灰飞虱和褐飞虱的 OBPs 亲缘关系较远。

通过构建小菜蛾 *PxylOBP2* 的原核表达载体 pET28a-*PxylOBP2*，并将其转化到大肠杆菌 BL21（DE3）中，经过 IPTG 诱导，虽然实现了该基因的体外原核表达，但重组菌经超声波破碎后的 SDS-PAGE 结果显示为包涵体，上清中没有目的蛋白。尽管后来通过降低温度、IPTG 浓度等进行了条件优化，上清中仍没有检测出目的蛋白。形成包涵体可能与 pET28a 表达载体本身高表达性质有关。因为，一方面蛋白表达量越高越容易形成包涵体，蛋白合成的速度太快，没有足够的时间进行折叠，二硫键不能正确地配对（吉挺等，2014）；另一方面，原核表达系统中缺失促使蛋白正确折叠的各种影响因子。但是，包涵体经纯化后送公司制备多克隆抗体，Western blot 检测抗体的特异性结果表明多克隆抗体制备成功，为后续深入研究小菜蛾免疫荧光定位奠定基础。

表达谱分析是研究基因功能的重要途径（钱凯等，2015）。不同发育阶段表达谱分析发现，*PxylOBP2* 在未交配的雄虫中的表达量最高，是交配雄虫中的 6 倍，其他阶段表达水平较低或差别不大，相同的例子还在甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 和麦红浆吸虫 *Sitodiplosis mosellana* 中发现（Zhu *et al*., 2013；Gong *et al*., 2014），已交配的雄虫 *PxylOBP2* 的表达量显著下降，据此推测这个基因在雄性成虫中发挥更大的作用，可能与雄虫识别环境中的性信息素，寻求配偶有关。昆虫在除了触角外的其他组织也分布有嗅觉或者味觉感受器，可能参与了寄主植物的定位和选择（Li *et al*., 2013）。不同组织表达谱分析显示，*PxylOBP2* 在雄虫足中的表达量最高，这与雄虫可以更有效地感受环境中的各种化学因子有关，气味结合蛋白在足中表达量高还出现在其他昆虫中，比如西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 足上有大量的刺形感器，在化学机械感受方面行使着特定的功能（张治科等，2015）。昆虫足上分布着大量的味觉感受器，*PxylOBP2* 在雄虫足中高表达，推测可能和感知寄主植物非挥发性物质有关（Pelletier and Leal, 2009；Xu *et al*., 2010；Mitaka *et al*., 2011；Gu *et al*., 2011）。

雄虫在寻求配偶时除了需要性信息素吸引外，寄主植物挥发物也有助于雄虫寻找配偶（宋月芹等，2014）。根据本试验荧光竞争结合数据，小菜蛾 PxylOBP2 与信息素顺 11-16 碳烯乙酸酯可以结合，但结合能力不如寄主植物挥发物，结合能力最强的是寄主植物挥发物芳樟醇、正壬醇，其次与 4 种醛类物质均可以结合，因为醛基在触角感受器淋巴液中的溶解度很高，更容易被昆虫识别，与前人研究结果一致（陈玲等，2013）。最后是酯类、烯类等寄主植物挥发物质。我们推测羟基（－OH）、醛基（－C＝OH）、羰基（－C＝O）等官能团可能会影响气味分子的结合能力；与番茄挥发物 α-蒎烯也可以有效结合，推测 PxylOBP2 在小菜蛾的趋避行为中也发挥一定的作用；PxylOBP2 与几种气味分子不能有效结合，与气味结合蛋白选择性绑定气味分子这一生理功能相符（Manoharan *et al*.，2013）。有研究表明寄主植物挥发物可以和信息素协同作用完成一些生理行为（沈幼莲等，2009），因此，我们推测 PxylOBP2 蛋白可以有效结合芳樟醇、正壬醇，这两种化合物协同促进小菜蛾寻找配偶。今后可以通过 EAG、行为学反应和田间试验进一步研究和确证。

参考文献（References）

Breer H, Krieger J, Raming K, 1990. A novel class of binding proteins in the antennae of the silk moth *Antheraea pernyi*. *Insect Biochem*., 20(7): 735－740.

Chen L, Li HL, Zhou YX, Zhao L, Zhang LY, Ni CX, Shang HW, 2013. cDNA cloning, tissue expression and ligand binding characteristics of odorant-binding protein 2 from the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(6): 612－621. [陈玲, 李红亮, 周宇翔, 赵磊, 张林雅, 倪翠侠, 商晗武, 2013. 桔小实蝇气味结合蛋白 BdorOBP2 的 cDNA 克隆、组织表达及配基结合特性. 昆虫学报, 56(6): 612－621]

Furlong MJ, Wright DJ, Dosdall LM, 2013. Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects. *Ann. Rev. Entomol*., 58: 517－541.

Gong DP, Zhang HJ, Zhao P, Xia QY, Xiang ZH, 2009. The odorant binding protein gene family from the genome of silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 10: 332.

Gong ZJ, Miao J, Duan Y, Jiang YL, Li T, Wu YQ, 2014. Identification and expression profile analysis of putative odorant-binding proteins in *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (Diptera: Cecidomyiidae). *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 444 (2): 164－170.

Gu SH, Wang SP, Zhang XY, Wu KM, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2011. Identification and tissue distribution of odorant binding protein genes in the lucerne plant bug *Adelphocoris lineolatus* (Goeze). *Insect Biochem. Molec. Biol*., 41(4): 254－263.

He P, Zhang J, Liu NY, Zhang YN, Yang K, Dong SL, 2011. Distinct expression profiles and different functions of odorant binding proteins in *Nilaparvata lugens* Stäl. *PLoS ONE*, 6(12): e28921.

Hekmat-Scafe DS, Scafe CR, McKinney AJ, Tanouye MA, 2002. Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res*., 12(9): 1357－1369.

Ji T, Shen F, Liang Q, Wu LM, Liu ZG, Luo YX, 2014. Cloning, prokaryotic expression and tissue expression profiling of an OBP3 gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(8): 897－904. [吉挺, 沈芳, 梁勤, 吴黎明, 刘振国, 罗岳雄, 2014. 中华蜜蜂 OBP3 基因的克隆、原核表达及组织表达谱. 昆虫学报, 57(8): 897－904]

Jiang QY, Wang WX, Zhang Z, Zhang L, 2009. Binding specificity of locust odorant binding protein and its key binding site for initial recognition of alcohols. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 39 (7): 440－447.

Ju Q, Qu MJ, Wang Y, Jiang XJ, Li X, Dong SL, Han ZJ, 2012. Molecular and biochemical characterization of two odorant-binding proteins from dark black chafer, *Holotrichia parallela*. *Genome*, 55 (7): 537－546.

Krieger J, Nickisch-Roseenegk E, Mameli M, Pelosi P, Breer H, 1996. Binding proteins from the antennae of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 26(3): 297－307.

Leal WS, Nikonova L, Peng GH, 1999. Disulfide structure of the pheromone binding protein from the silkworm moth, *Bombyx mori*. *FEBS Lett*., 464: 85－90.

Li F, Prestwich GD, 1997. Expression and characterization of a lepidopteran general odorant binding protein. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 27(5): 405－412.

Li ZQ, Zhang S, Luo JY, Cui JJ, Ma Y, Dong SL, 2013. Two Minus-C odorant binding proteins from *Helicoverpa armigera* display higher ligand binding affinity at acidic pH than neutral pH. *J. Insect Physiol*., 59(3): 263－272.

Liu NY, Yang K, Liu Y, Xu W, Anderson A, Dong SL, 2015. Two general-odorant binding proteins in *Spodoptera litura* are differentially tuned to sex pheromones and plant odorants. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 180: 23－31.

Liu YP, Liu Y, Yang T, Gui FR, Wang GR, 2015. Identification and characterization of a general odorant receptor gene *PxylOR9* in the diamondback moth. *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(5): 507－515. [刘一鹏, 刘杨, 杨婷, 桂富荣, 王桂荣, 2015. 小菜蛾普通气味结合受体基因 *PxylOR9* 的鉴定及功能研究. 昆虫学报, 58(5): 507－515]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25: 402－408.

Manoharan M, Chong MNF, Vaïtinadapoulé A, Frumence E, Sowdhamini R, Offmann B, 2013. Comparative genomics of odorant binding proteins in *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, and *Culex*

quinquefasciatus. *Genome Biol. Evol.*, 5(1): 163 – 180.

McKenna MP, Hekmat-Scafe DS, Gaines P, Carlson JR, 1994. Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system. *J. Biol. Chem.*, 269(23): 16340 – 16347.

Mitaka H, Matsuo T, Miura N, Ishikawa Y, 2011. Identification of odorant-binding protein genes from antennal expressed sequence tags of the onion fly, *Delia antiqua*. *Mol. Biol. Rep.*, 38(3): 1787 – 1792.

Pelletier J, Leal WS, 2009. Genome analysis and expression patterns of odorant-binding proteins from the southern house mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *PLoS ONE*, 4(7): e6237.

Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvello M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63(14): 1658 – 1676.

Qian K, Feng B, Wu XL, Lao C, Shen YL, Du YJ, 2015. Cloning, sequence analysis, tissue expression profiling and prokaryotic expression of odorant binding protein genes *MaltOBP*2 and *MaltOBP*6 from *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(5): 496 – 506. [钱凯, 冯波, 巫诩亮, 劳冲, 沈幼莲, 杜永均, 2015. 松墨天牛 OBP 基因 *MaltOBP*2 和 *MaltOBP*6 的克隆、序列分析及组织表达谱和原核表达研究. 昆虫学报, 58(5): 496 – 506]

Robertson HM, Martos R, Sears CR, Todres EZ, Walden KKO, Nardi JB, 1999. Diversity of odourant binding proteins revealed by an expressed sequence tag project on male *Manduca sexta* moth antennae. *Insect Mol. Biol.*, 8(4): 501 – 518.

Shen YL, Gao Y, Du YJ, 2009. The synergism of plant volatile compounds and sex pheromones of the tobacco cutworm moth, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 51(12): 1290 – 1297. [沈幼莲, 高扬, 杜永均, 2009. 植物气味化合物与斜纹夜蛾性信息素的协同作用. 昆虫学报, 51(12): 1290 – 1297]

Song YQ, Xie XC, Dong JF, Wu JX, 2014. cDNA cloning, expression profiling and binding properties of odorant-binding protein GmolOBP3 in the oriental fruit moth, *Grapholota molesta* (Lepidoptara: Tortricidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(3): 274 – 285. [宋月芹, 解幸承, 董钧锋, 仵均祥, 2014. 梨小食心虫气味结合蛋白 GmolOBP3 的 cDNA 克隆、表达谱及结合特性分析. 昆虫学报, 57(3): 274 – 285]

Spinelli S, Lagarde A, Iovinella I, Legrand P, Tegoni M, Pelosi P, Cambillau C, 2012. Crystal structure of *Apis mellifera* OBP14, a C-minus odorant-binding protein, and its complexes with odorant molecules. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 42(1): 41 – 50.

Sun MJ, Liu Y, Wang GR, 2013. Expression patterns and binding properties of three pheromone binding proteins in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Insect Physiol.*, 59(1): 46 – 55.

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5827): 161 – 163.

Xu PX, Zwiebel LJ, Smith DP, 2003. Identification of a distinct family of genes encoding atypical odorant-binding proteins in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.*, 12(6): 549 – 560.

Xu W, Cornel AJ, Leal WS, 2010. Odorant-binding proteins of the malaria mosquito *Anopheles funestus sensu stricto*. *PLoS ONE*, 5(10): e15403.

You MS, Yue Z, He WY, Yang XH, Yang G, Xie M, Zhan DL, Baxter SW, Vasseur L, Gurr GM, Douglas CJ, Bai JL, Wang P, Cui K, Huang SG, Li XC, Zhou Q, Wu ZY, Chen QL, Liu CH, Wang B, Li XJ, Xu XF, Lu CX, Hu M, Davey JW, Smith SM, Chen MS, Xia XF, Tang WQ, Ke FS, Zheng DD, Hu YL, Song FQ, You YC, Ma XL, Peng L, Zheng YK, Liang Y, Chen YQ, Yu LY, Zhang YN, Liu YY, Li GQ, Fang L, Li JX, Zhou X, Luo YD, Guo CY, Wang JY, Wang J, Yang HM, Wang J, 2013. A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification. *Nat. Genet.*, 45: 220 – 225.

Zhang ZC, Wang MQ, Lu YB, Zhang GA, 2009. Molecular characterization and expression pattern of two general odorant binding proteins from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Chem. Ecol.*, 35(10): 1188 – 1196.

Zhang ZK, Wu SY, Lei ZR, 2015. cDNA cloning, expression profiling and immunolocalization of a chemosensory protein in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(1): 1 – 14. [张治科, 吴圣勇, 雷仲仁, 2015. 西花蓟马化学感受蛋白的 cDNA 克隆、时空表达分析及组织定位. 昆虫学报, 58(1): 1 – 14]

Zhou JJ, 2010. Odorant-binding proteins in insects. *Vitam. Horm.*, 83: 241 – 272.

Zhou JJ, He XL, Pickett JA, Field LM, 2008. Identification of odorant-binding proteins of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: genome annotation and comparative analyses. *Insect Mol. Biol.*, 17(2): 147 – 163.

Zhou JJ, Huang WS, Zhang GA, Pickett JA, Field LM, 2004. "Plus-C" odorant-binding protein genes in two *Drosophila* species and the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Gene*, 327(1): 117 – 129.

Zhu JY, Zhang LF, Ze SZ, Wang DW, Yang B, 2013. Identification and tissue distribution of odorant binding protein genes in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.*, 59(7): 722 – 728.

(责任编辑: 袁德成)